

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ

УДК 619:578

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ БАЦИЛЛ В ПОЧВЕ

Бахаровская Е.О., 5 курс, 2 группа факультет ветеринарной медицины,
Научные руководители: Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н.
ФГБОУ ВПО «УльяновскаяГСХА»

Бациллу впервые обнаружил под микроскопом Ф. Поллендер в Германии в 1849 г. В России Ф. Брауэль в 1857 г. нашел палочки (вибрионы) в крови человека, умершего от сибирской язвы, и экспериментально воспроизвел болезнь у животных, заразив их кровью, содержащей эти микробы. Лишь в 1863 г. К. Давэн окончательно установил, что они являются возбудителем сибирской язвы. Этот год считают официальной датой открытия бациллы сибирской язвы [1,2].

Культуру возбудителя болезни удалось получить лишь в 1876 г. Сначала Р. Коху, а затем Л. Пастеру. Независимо друг от друга они заразили этой культурой животных, воспроизвели болезнь и открыли, что палочки сибирской язвы способны формировать споры. В 1888 г. Серафини у сибиреязвенных бацилл обнаружил капсулу. В России культуру сибиреязвенного микроба впервые получил В.К. Высокович (1882) [1,2].

Сибирская язва (*Anthrax*) - уникальная инфекционная болезнь животных и человека, т.е. является – зооантропонозом. Раз, возникнув в какой-либо местности, она может сохраняться, сохраняя на многие десятилетия угрозу повторных вспышек.

Современная статистика регистрирует новые очаги болезни в ранее благополучной местности или «ожившие» по тем или иным причинам (земляные работы, водная или ветровая эрозия, наводнение, землетрясение и т.п.) старые очаги в стационарно неблагополучной местности. Зарегистрированные ранее очаги, которые не проявляют в данный момент активности, текущей статистикой не учитываются. Сведения о них можно получить из сибиреязвенных кадастров, отчетов, эпизоотических журналов и эпизоотических карт, публикаций. Однако эти места гибели животных или захоронения сибиреязвенных трупов остаются потенциально опасными.

Ветеринарно-санитарными правилами, утвержденными в РФ в 1996 году, при организации противосибиреязвенных мероприятий следует различать эпизоотический очаг, стационарно неблагополучный пункт, почвенный очаг и угрожаемую по этой болезни территорию. Поэтому применительно к сибирской язве должны учитываться и новые (свежие), и ранее установленные потенциально опасные очаги.

Решение проблемы ликвидации сибирской язвы во многом зависит от знания экологии возбудителя с учетом влияния на него различных факторов

внешней среды, закономерностей распространения болезни, особенностей эпизоотического ее проявления. Следует учитывать, что область распространения сибирской язвы связана с почвенно-географическими зонами. Поэтому большую роль играют эффективные методы выявления и санации почвенных очагов возбудителя.

В последнее время в СМИ встречается информация об обнаружении возбудителя сибирской язвы в районах, имеющих на своей территории сибиреязвенные скотомогильники. В связи с этим, актуальным становится вопрос о возможной контаминации участков почвы, прилегающих к скотомогильникам, сибиреязвенной бациллой.

Целью наших исследований было проведение индикации *Bac.anthraxis* с помощью высокоспецифичных бактериофагов («К» ВИЭВ и «Гамма» МВА) на территории, прилегающей к скотомогильнику находящемуся на территории поселка Октябрьский Ульяновской области. На территории п.Октябрьский заболевание регистрировалось в 1958г.

Материалом для исследования послужила почва вблизи сибиреязвенного скотомогильника находящегося на территории п. Октябрьский.

Пробы почвы отбирали вокруг скотомогильника (4 участка по 1 м²) на каждом из участков в его пяти точках по принципу «конверта» (четыре точки по углам и одна в центре). Общая масса пробы с 1 участка 1 кг (0,2 кг x 5).

Отобранные образцы помещали в стерильную посуду и доставляли в лабораторию. Т.к. было невозможно приступить к исследованию почвы немедленно, то образцы хранили при температуре 4-5°С (в условиях холодильника), не более 24 часов.

Для приготовления среднего образца объемом 0,5 кг почву всех образцов одного участка высыпали на стерильный плотный лист бумаги, тщательно перемешивают стерильным шпателем, отбрасывают камни и прочие твердые предметы. Затем почву распределяют на месте ровным тонким слоем в форме квадрата.

Диагоналями почву делили на 4 треугольника. Почву из двух противоположных треугольников отбрасывали, а оставшуюся вновь перемешивали, опять распределяют тонким слоем и делят диагоналями и так до тех пор, пока не осталось примерно 0,5 кг.

Перед посевом почву диспергировали, т.е. почву с соблюдением условий стерильности просеивают через сито диаметром 3 мм. При просеивании сито сверху покрывали стерильной бумагой.

Для обнаружения патогенных микроорганизмов была необходима навеска почвы весом (50 – 50,5 г). Почву исследовали методом серийных разведений. Первое разведение навески почвы (1 : 10) делали в стерильной посуде, добавляя стерильную водопроводную воду в соотношении 1 : 10 к весу почвы (например: 1 г воды, 10 г почвы – в 100 мл воды и т. п.).

Далее проводили предварительную обработку почвы, целью которой явилось извлечение клетки микроорганизмов из почвенных агрегатов.

Предварительную обработку почвы проводили следующим способом: 10-минут встряхивали почвенную суспензию первого разведения в колбе с резиновой пробкой (50 г почвы в 450 мл стерильной водопроводной воде).

Почвенную суспензию, содержащую в 1 мл 0,1 г почвы, через 30 секунд после предварительной обработки использовали для приготовления последовательно убывающих концентраций почвы. Для этого из первого разведения, находящегося во флаконе, с содержанием почвы 0,1 г/мл стерильной пипеткой отбирают 1 мл и переносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. При этом получают второе разведение, содержащее 0,01 г/мл почвы. Повторяя эту операцию, доводят разведение почвы до 0,0001–0,000000001 г/мл.

Приготовленные разведения использовали для посева на МПА газонем с целью определения в образцах бактерий рода *Bacillus*.

Проба с бактериофагом (лизабельность фагом). Сибирезвенный фаг, взаимодействуя с гомологичной культурой, вызывает её лизис. Эта реакция высокоспецифична, и ее применяют для идентификации бациллы антракса, а также дифференциации их от ложносибирезвенных бацилл [3]. В качестве индикаторных у нас в стране выпускают два штамма фагов: «К» ВИЭВ и «Гамма» МВА и их мы применили в своих исследованиях.

Для индикации бактерий вида *Bac.anthraxis* мы использовали метод «Стекающая капля». Для этого мы почвенную суспензию засекали газонем на МПА разлитый в чашки Петри и на газон наносили каплю сибирезвенного бактериофага. Чашку Петри наклоняли и капля стекала. Затем опытную чашку Петри помещали в термостат при температуре 37⁰ С.

Учет результатов проводили после 24 часов инкубации опытных чашек Петри в термостате.

В результате проведенных исследований было установлено, что дезинфекция, проведенная в соответствии с нормативно-технической документацией, эффективна, так как возбудитель сибирской язвы на территории, прилегающей к скотомогильнику п. Октябрьский не выявлен.

Библиографический список

1. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва (Антракс) Новые страницы в изучении «старой» болезни./ Изд-во «Посад» Владимир, 2001г. 284с.
2. Ипатенко Н.Г. Изучение культурально-морфологических особенностей и вирулентных свойств *Bac. anthracis*, выделенных из почвы, от больных и павших животных. - М., 1979.
3. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии // Учебное пособие. – Ульяновск. – 1988. - С.45.

BACTERIOPHAGE FOR DISPLAY PATHOGENIC BACILLI IN SOIL

Baharovskaya E.O., Pulcherovskaya L.P., Zolotukhin S.N.

The paper presents data on the bacteriophage to indicate the pathogenic bacilli in soil.